



TITLE:

A screening for DNA damage response molecules that affect HIV-1 infection(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yoshinaga, Noriyoshi

CITATION:

Yoshinaga, Noriyoshi. A screening for DNA damage response molecules that affect HIV-1 infection. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21996>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	吉 永 則 良
論文題目	A screening for DNA damage response molecules that affect HIV-1 infection (HIV-1 感染に影響する DNA 損傷応答分子のスクリーニング)		
(論文内容の要旨)			
<p>HIV-1 はそのゲノム RNA を逆転写酵素により二本鎖 DNA に変換し、宿主ゲノムに組み込むことで感染を成立させたのち、ゲノムに組み込まれたウイルス DNA を元に新たなウイルス粒子を産生する。その過程において形成される様々なウイルス DNA 中間体は、宿主の DNA 損傷応答分子により認識され、影響を受ける可能性がある。</p> <p>HIV-1 感染に影響を与える DNA 損傷応答分子のスクリーニングとして、ニワトリ B リンパ細胞株である DT40 において様々な DNA 修復分子を欠失した変異細胞株群を用いて、ルシフェラーゼをレポーターに持つ HIV-1 偽ウイルスの感染効率の検討を行った。その結果、<i>RAD18</i> -/- DT40 細胞では親細胞と比較し 2 倍以上の HIV-1 の感染効率の上昇を、<i>POLZ</i> -/-、<i>EXO1</i> -/-、<i>TP53BP1</i> -/-、<i>FEN1</i> -/-、<i>POLH/Z</i> -/-、<i>ATM</i> -/-、<i>WRN</i> -/- DT40 細胞では親細胞と比較しそれぞれ HIV-1 の 50%以上の感染効率の低下が認められた。</p> <p>次に、これらの因子がウイルス複製のどの段階で作用しているかを明らかにするために、これらの細胞株において逆転写後期産物、2-LTR 環状 DNA、および組み込まれたプロウイルスについて、定量的 PCR により解析したところ、<i>EXO1</i> -/-、<i>TP53BP1</i> -/-、<i>WRN</i> -/- DT40 細胞において 2-LTR 環状 DNA の上昇とプロウイルスの低下を認め、これらの因子がインテグレーションに補助的に働いている可能性が示唆された。<i>RAD18</i> -/- DT40 細胞では後期逆転写産物の早期上昇を認め、RAD18 が逆転写過程に抑制的に働いている可能性が示唆された。</p> <p>これらの結果から HIV-1 の感染に対し抑制的に働くことが示唆された RAD18 の機能的関与を検討するために、ヒト細胞および RAD18 変異体を用いて検討した。RAD18 の機能ドメインとして、E3 リガーゼとして働くために必要な RING ドメイン、相同組み換えの過程に必要な Zinc finger ドメイン、DNA に結合する SAP ドメインが知られているが、その機能欠失変異体を用いて検討した所、SAP ドメインの変異体を過剰発現させた細胞株では感染効率の低下はほとんど認めなかったが、RING ドメインおよび Zing finger ドメインの変異体を過剰発現させた細胞株では、野生体とほぼ同程度の感染効率の低下を認めた。RAD18 とウイルス DNA の結合を証明するために、myc タグを付けた RAD18 の野生体、SAP ドメインの変異体を 293T 細胞に過剰発現させウイルスを感染させたのち、免疫沈降を行った。それぞれのタンパクに結合している HIV-1-DNA を定量 PCR で評価した所、野生体の RAD18 は SAP ドメインの変異体と比較し、より多くの HIV-1-DNA と結合していた。</p> <p>以上より RAD18 による HIV-1 の抑制機構として、RAD18 が直接ウイルス DNA に結合することで逆転写反応に抑制的働くことを明らかにした。この結果はウイルス逆転写反応について新たな機能的洞察を提供するものである。</p>			

<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>HIV-1 の感染過程において宿主細胞内に形成されるウイルス DNA 中間体は、宿主の DNA 損傷応答分子の影響を受ける可能性がある。本論文では、HIV-1 感染に影響を与える DNA 損傷応答分子のスクリーニングとして、それらの分子を欠失した DT40 細胞クローン群を用い、HIV-1 偽ウイルスの感染効率や種々のウイルス DNA 産物の定量的 PCR による解析を行った。EXO1、TP53BP1、および WRN はインテグレーションに補助的に、RAD18 は逆転写過程に抑制的に働いている可能性を示唆する結果を得た。次に、RAD18 変異体を用いた検討では、DNA 結合に関与すると報告されている SAP ドメインの変異体を過剰発現させた細胞株では感染効率の低下は限定的であったが、他のドメインの変異体を過剰発現させた細胞株では、RAD18 野生体を過剰発現させた場合とほぼ同程度の感染効率の低下を認めた。さらに、ウイルス感染細胞からの RAD18 免疫沈降物中にウイルス DNA を検出したが、SAP ドメイン変異体では野生体と比較し有意に少ない量の HIV-1-DNA しか検出せず、RAD18 がウイルス DNA に直接結合することで逆転写反応に抑制的に働く可能性を示した。</p> <p>以上の研究は RAD18 による HIV-1 の感染抑制機構の解明に貢献しウイルスの逆転写反応について新たな機能的洞察に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和元年 6 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			